

УДК 577.112:633.11

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. Т.И. Одинцова¹, Т.В. Коростылева¹, Л.Л. Уткина¹, Я.А. Андреев²,
А.А. Славохотова¹, Е.А. Истомина¹, В.А. Пухальский¹, Ц.А. Егоров²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: odintsova2005@rambler.ru;

² Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 11 ноября 2011 г. Принята к публикации 21 декабря 2011 г.

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой низкомолекулярные защитные полипептиды, которые образуются в клетках всех живых организмов постоянно или в ответ на атаку патогена. Они являются важнейшими компонентами защитной системы как животных, так и растений. АМП различаются по структуре и механизмам действия. Большинство из них относится к цистеин-богатым пептидам, содержащим четное число остатков цистеина, образующих дисульфидные связи, что придает их молекулам структурную стабильность. На основе гомологии аминокислотных последовательностей и пространственной структуры выделяют несколько семейств АМП растений. Гены АМП растений могут быть использованы для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений путем генетической трансформации, а также для разработки на их основе новых антибактериальных и антигрибковых лекарственных препаратов. В настоящем обзоре кратко изложены свойства и структура генов основных исследованных авторами семейств антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae* – глицин-богатых пептидов, дефензинов, гевеиноподобных пептидов, а также семейства 4-Cys пептидов.

Ключевые слова: пшеница *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch., антимикробные пептиды, секвенирование аминокислотных последовательностей, 3'- и 5'-RACE, иммунитет растений, регуляция экспрессии генов.

Введение

Пшеница является основной зерновой культурой для 35 % населения земного шара, под посевами которой занято 216 млн га (Vasil, 2007). Патогенные микроорганизмы и насекомые-вредители наносят существенный урон культивируемым сортам. Использование средств химической защиты растений требует значительных материальных затрат и наносит значительный ущерб экологии. Альтернативная стратегия повышения устойчивости предполагает укрепление защитной системы самих растений как за счет усиления экспрессии защитных генов, так и с помощью встраивания в геном чувствительных растений генов защитных белков из других, устойчивых, видов. По сравнению с другими подходами, генетическая трансформация имеет ряд преимуществ. Во-первых, данный метод позволяет использовать гены любого проис-

хождения. Во-вторых, возможность введения в геном единичных генов и предварительного тестирования их продуктов на безопасность обуславливает высокую точность и надежность данного подхода. В-третьих, при использовании генетической трансформации чужеродные гены могут быть предварительно модифицированы с целью изменения их свойств.

Важнейшей группой защитных полипептидов являются антимикробные пептиды (АМП), обнаруженные у про- и эукариот. Они представляют собой древнейший механизм защиты от патогенов (Castro, Fontes, 2005; Manners, 2007; Farrokhi *et al.*, 2008; Sels *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008; Ajesh, Sreejith, 2009; Benko-Iseppon *et al.*, 2010; da Rocha Pitta *et al.*, 2010; Kido *et al.*, 2010; Padovan *et al.*, 2010).

Представление об участии АМП в защите растений сформировалось исходя из комплекса экспериментальных фактов. Об этом свиде-

тельствовались: обнаруженная у них в системе *in vitro* антимикробная активность, усиление экспрессии их генов в ответ на биотический и абиотический стрессы, а также повышение устойчивости к патогенам трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих гены антимикробных пептидов (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, 2001).

Несмотря на разнообразие аминокислотных последовательностей, АМП обладают общими физико-химическими свойствами: небольшим размером (менее 10 кДа) и положительным зарядом молекул, а также амфифильностью структуры. Эти свойства позволяют АМП взаимодействовать с клеточными стенками и мембранами микроорганизмов, нарушая их проницаемость, что и лежит в основе их антимикробного действия (Dubovskii *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2001). Детально механизмы ингибирующего действия АМП растений на патогены не изучены. Большинство имеющихся данных свидетельствуют о вызванном ими повреждении целостности мембран патогенов, образовании пор и нарушении барьерной функции. Появились также данные о действии некоторых АМП на внутриклеточные мишени микроорганизмов (Lobo *et al.*, 2007; Van der Weerden *et al.*, 2008).

Интерес, проявляемый к АМП в последние годы, связан как с возможностью использования их генов для создания устойчивых форм сельскохозяйственных растений, так и с перспективностью их применения для разработки лекарственных препаратов нового поколения.

Большинство АМП растений относятся к цистеин-богатым пептидам, в молекулах которых содержится четное число остатков цистеина (2, 4, 6, 8 и 10), образующих дисульфидные связи, что придает их молекулам высокую структурную стабильность. По гомологии аминокислотных последовательностей, цистеинового мотива (расположения остатков цистеина в полипептидной цепи) и пространственной структуры различают несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липидпереносящие белки (ЛПБ), гевино- и ноттиноподобные пептиды, а также макроциклические пептиды (циклотиды) (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, 2001).

Начиная с 1990 г. АМП были выделены из ряда растений, однако многие аспекты, каса-

ющиеся самих пептидов (компонентного состава у отдельных видов растений, механизма их действия, специфичности в отношении патогенов), а также структуры их генов и регуляции экспрессии, оставались мало изученными. Наиболее детально был проведен анализ катионных АМП зерновок пшеницы вида *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. (Egorov *et al.*, 2005), кроме того, была установлена структура генов некоторых из них. Гексаплоидная пшеница *T. kiharae* Dorof. et Migusch. (геномная формула A^bGD) представляет собой синтетический аллополиплоид, полученный от скрещивания *Triticum timopheevii* с *Aegilops tauschii*. Этот вид обладает повышенной устойчивостью к патогенам.

Для выделения АМП из зерновок *T. kiharae* был разработан метод, сочетающий в себе различные типы высокоэффективной жидкостной хроматографии (аффинную, эксклюзионную и обращенно-фазовую) в комбинации с секвенированием аминокислотных последовательностей по Эдману и масс-спектрометрией (Egorov *et al.*, 2005). В результате из семян *T. kiharae* было выделено и охарактеризовано 24 новых антимикробных пептида и показано, что в этом виде присутствуют практически все известные у растений семейства АМП: тионины, дефензины, ноттиноподобные пептиды и липидпереносящие белки. Кроме известных семейств, в этом виде были обнаружены новые семейства, ранее не описанные у растений. Так, были открыты семейство глицин-богатых пептидов, семейство четырехцистеиновых (4-Cys) пептидов, новое подсемейство дефензинов D и новый структурный тип гевиноподобных пептидов. Эти новые АМП и будут рассмотрены ниже.

Глицин-богатые пептиды

В этом семействе обнаружено 4 структурно различающихся глицин-богатых пептида, не содержащих остатков цистеина в молекуле (Egorov *et al.*, 2005) (табл. 1).

Для этих пептидов, помимо высокого содержания глицина, характерно наличие повторяющихся олигопептидных мотивов, причем различных для разных членов семейства, таких, как G_nYPGH в пептидах Tk-AMP-G1 и Tk-AMP-G2 или G_nYP в пептидах Tk-AMP-G3 и Tk-AMP-G4, где *n* – переменное число. Наличие

Таблица 1

Глицин-богатые пептиды пшеницы *T. kiharae**

Пептид	N-концевая аминокислотная последовательность	Молекулярная масса, Да
Tk-AMP-G1	GGGGGGGGYHGGGGGG YPGH ²⁰	4294
Tk-AMP-G2	GGGGAGGG YPGH GGGG YPGH GGGGGGGG YPGH GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG ⁵⁰	4375
Tk-AMP-G3	GGYP GGGGGG ¹⁰	4668
Tk-AMP-G4	GGYP GGGGAG ¹⁰	4750

* Повторяющиеся аминокислотные мотивы выделены жирным шрифтом.

повторов в аминокислотных последовательностях глицин-богатых пептидов может отражать происхождение кодирующих их генов путем многократных дубликаций предкового гена. Ранее пептиды такого типа в семенах растений описаны не были. Испытания антифунгальной активности этих пептидов в отношении ряда фитопатогенных грибов показали, что глицин-богатые пептиды вызывают морфологические изменения у грибов при концентрациях 100–150 мкг/мл (Egorov *et al.*, 2005). Интересно, что глицин-богатые АМП широко распространены у насекомых (Bulet *et al.*, 1999). Наши данные о наличии сходных пептидов в пшенице свидетельствуют о том, что они могут быть составной частью защитного арсенала также у растений.

Дефензины

Дефензины являются древнейшим семейством АМП, поскольку были обнаружены у всех живых существ. В семенах *T. kiharae* были частично охарактеризованы 11 дефензинов, которые по гомологии N-концевых последовательностей были подразделены на 3 структурные группы: Tk-AMP-D (группа I), Tk-AMP-γ1, Tk-AMP-γ2, Tk-AMP-γ3 (группа II), Tk-AMP-ω2 и ω3 (группа III). Большинство из них (пептиды Tk-AMP-D) представляют собой новый подкласс дефензинов пшеницы – дефензины группы I. Из семян *T. kiharae* в общей сложности было выделено 8 дефензинов этой группы (табл. 2) (Odintsova *et al.*, 2007).

Сравнение аминокислотных последовательностей дефензинов D показало, что исследованные пептиды высокогомологичны, т. е. представляют собой семейство близкородственных

пептидов. Различия по длине молекул связаны с делециями аминокислотных остатков между позициями 35 и 42 полипептидной цепи (нумерация остатков приведена по D1). Дефензины D различаются также по заряду молекул. Как и большинство АМП, все дефензины D, кроме D1.1, положительно заряжены. Основные различия в аминокислотной последовательности наблюдаются в C-концевой области молекул. Тем не менее даже в этой области обнаруживаются определенные закономерности: перед остатком Cys6 всегда расположен остаток основной аминокислоты, остатки Cys6 и Cys7 разделены гидрофобным аминокислотным остатком, и в положении 47 всегда расположен остаток основного характера, (нумерация остатков приведена по последовательности D1) (Odintsova *et al.*, 2007).

Прослеживается также гомология с дефензинами других видов злаков. Сравнение аминокислотных последовательностей дефензинов D с дефензинами других злаков выявило наибольшую гомологию с TAD1, дефензиноподобным пептидом, экспрессирующимся в проростках пшеницы при холодовой адаптации (Koike *et al.*, 2002). В то же время гомология с дефензинами растений, принадлежащих к другим ботаническим семействам, довольно низкая (Odintsova *et al.*, 2007).

Помимо дефензинов *T. kiharae*, были также выделены гомологи дефензинов D из родственных видов злаков (Odintsova *et al.*, 2007). Для исследования были взяты ряд диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов родов *Triticum* и *Aegilops*, предполагаемых доноров геномов A, B и D полиплоидных пшениц. Дефензины D были обнаружены у всех исследо-

Таблица 2

Аминокислотные последовательности дефензинов *T. kiharae*

Пептид	Аминокислотная последовательность*
Tk-AMP-D1	RTCQSQSHKFKGACFSDTNCDSVCRTE ^h NFPRGQCNQHHVERKCYCERDC
Tk-AMP-D2	RTCESQSHKFKGECFSDSNCAIVCRTE ^h NFPRGQCNQHHVERKCYCERS ^b C
Tk-AMP-D1.1	RDCESDSHKFKFHGACFSDTNCANVCQTEGFTAGKCVG--VQRHCHCTKDC
Tk-AMP-D5	RRCRESK ^h KFVGLCVSDTNCASVCLTE ^h FPGGKCDG--Y--RRCFCTKDC
Tk-AMP-D6	RDCRSQSK ^h TFVGLCVSDTNCASVCLTE ^h FPGGKCDG--Y--RRCFCTKDC
Tk-AMP-D6.1	RRCRSQSK ^h QFVGLCVSDTNCASVCLTE ^h FPGGKCDG--Y--RRCFCTKDC
Tk-AMP-D3	RDC ^h KSDSHKFKFHGACFSDTNCANVCQTEGFTRGKCDG--I--HCHCIKDC
Tk-AMP-D4	RDC ^h TSQSHK ^h TFVGLCLLSDRNCASVCLTEYFTCGKCD ^h --RRCVCTKGC
Консенсусная последовательность	R-C-S-Sb-F-GhChSD-NC--VC-TE-F--G-C-----bChC-b-C

* Последовательности выровнены вручную и расположены по мере уменьшения молекулярной массы пептидов. Пропуски введены для достижения максимальной гомологии. Аминокислотные остатки, различающиеся у всех или некоторых последовательностей, выделены соответственно темно-серым и светло-серым цветом. В нижней строке приведена консенсусная последовательность, в которой консервативные остатки цистеина и некоторых других аминокислот выделены жирным шрифтом. «h» и «b» – гидрофобные и основные аминокислоты соответственно.

ванных видов, однако их набор у видов разного геномного состава различался. У диплоидных и тетраплоидных форм пшениц были выявлены только некоторые из дефензинов, обнаруженных у полиплоидных форм. У диплоидного вида *T. monosocum*, который является вероятным донором генома А, были идентифицированы дефензины D4 и D5. Вместо D1 у этого вида было обнаружено 2 пептида, гомологичных D1. У *Ae. speltooides*, вероятного донора генома В, в семенах были выявлены дефензины D2 и D6.1. Кроме того, был обнаружен новый дефензин, гомологичный D3 и названный D3.1. Этот дефензин не был обнаружен у других исследованных видов, по-видимому, он специфичен для *Ae. speltooides*. У *Ae. tauschii*, донора генома D пшеницы, были идентифицированы дефензины D2, D3 и D6. У двух тетраплоидных видов пшеницы *T. timopheevii* (геномная формула A^bG) и *T. militinae* (A^bG) наборы дефензинов были сходными: D1/D1.2, D2, D4, D5 и D6.1. Дефензины D3 и D6, кодируемые генами, локализованными в геноме D, у *T. timopheevii* и *T. militinae* отсутствовали. У гексаплоидных видов пшеницы *T. kiharae* и *T. aestivum* (сорта Хакасская и Родина) набор дефензинов был одинаков.

В целом из семян *T. kiharae*, а также родственных видов *Triticum* и *Aegilops* было выделено 10 новых дефензинов и установлены

аминокислотные последовательности 9 из них. Показана высокая гомология первичной структуры дефензинов в пределах вида, особенно в N-концевой области молекулы. Установлено, что структура дефензинов D высококонсервативна в эволюции (Odintsova *et al.*, 2007). С использованием биохимических подходов высказано предположение о локализации генов, кодирующих дефензины, в геномах полиплоидной пшеницы: дефензины D1, D4 и D5 ассоциированы с геномом А, D2 и D6.1 – с геномом В, а D2, D3 и D6 – с геномом D (Odintsova *et al.*, 2007).

Гевеиноподобные пептиды WAMP

Из семян пшеницы *T. kiharae* было выделено два новых пептида WAMP-1a и WAMP-1b, различающихся по присутствию дополнительного C-концевого остатка аргинина у WAMP-1b (Odintsova *et al.*, 2009). Эти пептиды обладают гомологией с гевеиноподобными АМП. На основании этого они были отнесены к семейству гевеиноподобных АМП растений. (Гевеин – это лектин из латекса гевеи. Молекула этого пептида содержит 8 остатков цистеина, которые образуют характерный «цистеиновый мотив». Все АМП, которые похожи на гевеин по первичной структуре, в том числе и по «цистеиновому мотиву», относят к семейству гевеиноподобных

пептидов. Гевеиновый домен входит в состав всех хитин-связывающих белков, которым приписывается роль в защите растений от патогенных грибов и насекомых-вредителей.) Несмотря на сходство с гевеином, в пептидах WAMP-1 содержится 10 остатков цистеина, 2 из которых расположены уникальным образом, поэтому их можно выделить в особый структурный тип 10-Cys гевеиноподобных пептидов с новым цистеиновым мотивом (рис. 1). Обращает на себя внимание сходство пептидов WAMP с хитин-связывающими доменами хитиназ класса 1 (рис. 1).

До исследований пептидов пшеницы (Odintsova *et al.*, 2009) было известно лишь два 10-Cys гевеиноподобных пептида, выделенных из коры деревьев *Eucommia ulmoides* Oliv. (Huang *et al.*, 2002) и *Eunymus europaeus* L. (Van den Bergh *et al.*, 2002). Эти АМП хотя и имеют 10 остатков цистеина в молекуле, так же как пептиды WAMP, однако отличаются от них по их расположению (рис. 1) (Odintsova *et al.*, 2009).

В пептидах WAMP аминокислотные остатки хитин-связывающего центра, который участвует в связывании углеводов клеточной стенки грибов, заслуживают особого внимания. У всех изученных хитин-связывающих белков в этом сайте находятся несколько консервативных остатков: серин в 19 положении, два остатка глицина в положениях 22 и 25 и 3 ароматических аминокислотных остатка в положениях 21,

23 и 30 (нумерация приведена по аминокислотной последовательности гевеина). В пептидах WAMP консервативный остаток серина заменен на глицин. Однако несмотря на эту замену, пептиды WAMP обладают способностью связываться с хитином в системе *in vitro* (Odintsova *et al.*, 2009). Функциональную значимость этой замены еще предстоит выяснить.

Методами спектроскопии ЯМР была установлена пространственная структура пептида WAMP-1a (Dubovskii *et al.*, 2011). Пептид представляет собой компактную глобулу, состоящую из четырех антипараллельных тяжей β -структуры, одного участка спирали 3_{10} и участка α -спирали. Структура стабилизирована 5 дисульфидными и 20 водородными связями. Расположение дисульфидных связей следующее: Cys4-Cys19, Cys13-Cys25, Cys18-Cys32, Cys37-Cys41. Дополнительная, пятая, дисульфидная связь образована Cys16 и Cys44. Замена серина на глицин в хитин-связывающем сайте увеличивает амфифильность молекулы, с которой, по всей видимости, и связана биологическая активность пептида, – способность ингибировать рост патогенов, содержащих и не содержащих хитин в клеточной стенке (см. ниже). Обращает на себя внимание сходство пространственной структуры пептида WAMP, включая расположение дисульфидных связей, с хитин-связывающим доменом хитиназ класса 1 злаковых. Эти данные свидетельствуют в пользу происхождения пептида WAMP-1a из

WAMP-1a	AQR C GDQARGAK C PN C LC C CKYGE C SGSDAY C GAG- S C Q S Q C RG C (R)
ChtBD	-EQ C GSQAGGAT C PN C L C SKFGF C GTTSDY C GTG-- C Q S Q C NG C
Ee-CBP	-QQ C GRQAGNRR C ANNL C CSQYGY C GRTNEY C CTS Q G C Q S Q C RR C G
Гевеин	-EQ C GRQAGGKL C PN N L C CSQWGW C GSTDEY C SPDHN C Q S N C KD
Ar-AMP	AGE C V-Q--G-R C PSGM C CSQFGY C GRGPKY C GR
Ac-AMP1	VGE C VR---G-R C PSGM C CSQFGY C GKGPKY C G (R)
	* * * * *

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей пептида WAMP-1a с гевеиноподобными АМП растений и хитин-связывающим доменом хитиназы класса I.

Пропуски введены для достижения максимальной гомологии. Консервативные остатки цистеина выделены черными столбцами. Звездочками отмечены консервативные остатки хитин-связывающего сайта. Остаток глицина, заменяющий консервативный остаток серина в хитин-связывающем сайте пептида WAMP-1a, выделен серым. В скобках указан номер в GenBank для хитин-связывающего домена хитиназы класса I пшеницы *Triticum aestivum* (AAR11388), гевеина *Hevea brasiliensis* (P02877) и гевеиноподобных пептидов WAMP-1a *Triticum kiharae* (P85966), Ee-CBP *Euonymus europaeus* (AAP35270), Ar-AMP *Amaranthus retroflexus* (Q512B2) и Ac-AMP1 *Amaranthus caudatus* (P27275). Остаток аргинина, указанный в скобках, присутствует в пептидах WAMP-1b и Ac-AMP1 соответственно.

гена хитиназы класса 1 путем потери области каталитического домена.

Для того чтобы получить достаточное количество пептида WAMP-1a для функциональных исследований, была проведена гетерологическая экспрессия синтетического гена этого пептида в клетках *E. coli* (Odintsova *et al.*, 2009). Целевой пептид экспрессировали в составе гибридного белка с тиоредоксином, который обеспечивает правильный фолдинг и правильное замыкание дисульфидных связей рекомбинантных белков. Кроме того, он снимает токсическое действие АМП на клетки прокариот, в которых осуществляется гетерологическая экспрессия. При использовании данных по аминокислотной последовательности пептида WAMP-1a из синтетических олигонуклеотидов был сконструирован ген, кодирующий этот пептид, методом полимеразной цепной реакции (Odintsova *et al.*, 2009). Полученный ген был клонирован в экспрессионный вектор рЕТ-32b, и образовавшаяся плаزمид (рЕТ-32-М-WAMP-1a) была использована для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). Выход очищенного рекомбинантного пептида WAMP-1a составил около 8 мг/л культуры.

Определение биологической активности рекомбинантного пептида WAMP-1a в отношении ряда грибов, включая дейтеромицеты и аскомицеты, выявило существенное ингибирование прорастания спор при микромолярных концентрациях пептида. IC_{50} варьировала от 5 до 30 мкг/мл в зависимости от вида гриба (Odintsova *et al.*, 2009).

Наибольшей ингибирующей активностью пептид обладал по отношению к *F. solani*, *F. oxysporum* и *H. sativum*: IC_{50} для этих грибов составляла всего 5 мкМ. Помимо ингибирования прорастания спор грибов, исследовали также морфологические изменения, индуцированные пептидом. Под действием пептида WAMP-1a у гриба *F. oxysporum* наблюдались ингибирование роста и потемнение гиф. У *H. sativum* наблюдались разрушение и обесцвечивание спор. Изучали также влияние пептида WAMP-1a на

развитие заболевания, вызванного оомицетом *Ph. infestans*. Оказалось, что пептид стабильно ингибирует развитие заболевания в течение 120 ч наблюдений. Пептид также протестировали на способность ингибировать рост фитопатогенных грамположительных (*C. michiganense*) и грамтрицательных (*P. syringae* и *E. carotovora*) бактерий, и была выявлена антибактериальная активность пептида. В случае грамположительных бактерий эффект был более выражен. Антифунгальные свойства пептида WAMP-1a, по всей видимости, связаны с его хитин-связывающей активностью, в то время как активность в отношении оомицета *Ph. infestans* и бактерий, которые лишены хитина, обусловлена реализацией какого-то иного механизма (Odintsova *et al.*, 2009).

Следующий этап нашей работы – установление полной нуклеотидной последовательности мРНК, кодирующей пептид WAMP. Методом 3'- и 5'-RACE с использованием вырожденных праймеров, подобранных по аминокислотной последовательности пептида WAMP-1a, была определена последовательность двух кДНК, кодирующих пептид WAMP-1a и его близкий гомолог WAMP-2. Обе кДНК имеют сходную структуру и кодируют предшественники пептидов WAMP, состоящие из сигнального пептида, последовательности зрелого пептида и С-концевого продомена (Неопубл. данные).

Исследования экспрессии генов пептидов WAMP показали, что она усиливается в ответ на заражение патогенами, причем величина индукции зависит от вида патогена, что подтверждает гипотезу о защитной роли этих пептидов в пшенице (Неопубл. данные).

4-Cys пептиды

Из семян *T. kiharae* было выделено 2 новых АМП, названных Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2, содержащих по 4 остатка цистеина в молекуле (Egorov *et al.*, 2005). Их аминокислотные последовательности следующие (Неопубл. данные):

Tk-AMP-X1
Tk-AMP-X2

¹TDDRCERM~~CQ~~HYHDRREKKQCMK~~G~~CRYGESD³¹
¹ADDRCERM~~CQ~~RYHDRREKKQCMK~~G~~CRYG²⁸.

Как видно, остатки цистеина Cys1 и Cys2, как и Cys3 и Cys4, разделены между собой тремя аминокислотами. Было установлено, что дисульфидные связи в пептидах следующие: Cys5-Cys25 и Cys9-Cys21, где цифрами обозначен порядковый номер аминокислотного остатка в полипептидной цепи.

Для характеристики вторичной структуры выделенных пептидов были получены спектры кругового дихроизма в области поглощения амидного хромофора. Результаты расчета содержания элементов вторичной структуры пептидов по программе CONTIN показали, что в пептидах α -спираль составляет 59,9 и 46,6 % для Tk-AMP-X1 и X2 соответственно; β -изгиб – 9,7 и 17,7 % для Tk-AMP-X1 и X2 соответственно, остальное – неупорядоченная структура (30 и 35% для X1 и X2 соответственно). Таким образом, по результатам анализа спектра КД выделенные пептиды отнесены к α -спиральному типу молекул. Можно предположить, что пептиды Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X1 имеют структуру шпильки, в которой два α -спиральных участка расположены параллельно друг другу и «скреплены» двумя дисульфидными связями. Такую структуру имеет 4-Cys пептид дикорастущего злака – ежовника обыкновенного (Nolde *et al.*, 2011). Была исследована способность выделенных АМП ингибировать прорастание спор некоторых фитопатогенных грибов. Было установлено, что они ингибируют тестированные грибы в микромолярных концентрациях. Выявлены различия в ингибирующей активности между пептидами, несмотря на то что в аминокислотных последовательностях присутствуют лишь единичные замены.

Определение структуры полноразмерных кДНК, кодирующих пептиды Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2, проводили путем комбинации методов 3'- и 5'-RACE. Были получены несколько последовательностей кДНК, которые по длине подразделялись на 2 класса, условно названные «длинные» и «короткие» кДНК (Неопубл. данные). «Длинные» кДНК кодируют 7 гомологичных 4-Cys пептидов, а «короткие» – 5. При этом общая структура этих кДНК одинакова. Они состоят из 5'-нетранслируемой области, области, кодирующей сигнальный пептид, области, кодирующей 4-Cys пептиды и 3'-нетранслируемой области. Таким образом,

впервые была установлена модульная структура генов, кодирующих 4-Cys пептиды АМП пшеницы (рис. 2).

Анализ геномной ДНК показал, что в геноме пшеницы *T. kiharae*, помимо генов «длинных» и «коротких» предшественников, присутствуют и гены, кодирующие предшественники, содержащие 6 пептидов («средние» предшественники) (Неопубл. данные). Надо отметить, что предшественники этого типа не были получены при амплификации с кДНК зачатков семян. Это может быть связано с тем, что полипептиды такого типа не экспрессируются при созревании семян.

В целом «длинные» предшественники отличаются от «коротких» предшественников наличием двух дополнительных пептидных доменов (пятого и шестого), а от «средних» предшественников – наличием дополнительного, шестого, пептидного домена.

По гомологии аминокислотных последовательностей 4-Cys пептиды *T. kiharae*, кодируемые обнаруженными предшественниками, можно объединить в 7 групп, при этом гомология внутри групп очень высокая (70–100 %), а между группами низкая.

Для исследования роли 4-Cys пептидов в защите от патогенов изучали изменения экспрессии кодирующих их генов при заражении фитопатогенными грибами, а также при биотическом и абиотическом стрессе. Оказалось, что, как и в случае пептидов WAMP, экспрессия генов 4-Cys пептидов усиливается при заражении, при этом реакция на заражение также зависит от вида гриба. Абиотический стресс (повышенные температуры и солевой стресс) также активировали экспрессию этих генов. Эти данные свидетельствуют об участии пептидов этого семейства в ответных реакциях растений пшеницы на стресс.

Таким образом, полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о структурном и функциональном разнообразии АМП и кодирующих их генов у пшеницы.

Настоящая работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00250-а и 11-04-00190-а, программой Президиума РАН «Генофонды и генетическое разнообразие», а также Государственным контрактом Минобрнауки № 16.512.11.2156.

L-1-1		IRWCKEDCEWKAGQDTGKARE-CKEQCER
L-2-1 (M-1-1)		IRLCKKVC ^Q CDWKAGE ^D DTGKARE-CKEQCER
S-1-1		IRWCEEDCDWKAGQDTGKARE-CKEQCER
S-2-1		IRWCKEDCDWKAGQDTGKARE-CKEQCERGR
S-3-1		IRWCKEDCEWKAGQDTGKARE-CKERCER
S-4-1		IRLCKKVC ^Q CDWKAGE ^D DTGKARE-CKEQCERRRHGHEPQD
L-1-2 (S-3-2)	GRRRHGHEPQDEDDGGIPDRCKRECESHEDMDSKLR---CTLECWRRQQK	
S-4-2		GGIPDRCKRECESHEDMDSKLR---CTLECWRRQQK
L-2-2 (M-1-2)		GDSFDSCVSK ^Q CRGHGGWGWGKERWDR ^R CRRI ^Q CRQSQE
S-1-2 (X3)		GDSFDSCVSK ^Q CRGHGGWGWGKERWER ^R CR ^Q I ^Q CRQSQE
S-2-2		GDSFDSCVSK ^Q CRGHGGWGWGKERWER ^R CRRI ^Q CRQSQE
L-1-3		GDDR ^R ERM ^Q QHYHDRREKKQ---CMKGC ^R RY
L-2-3 (M-1-3) (X2)		A DDR ^R ERM ^Q QRYHDRREKKQ---CMKGC ^R RYG
S-1-3 (S-2-3) (X1)		T DDR ^R ERM ^Q QHYHDRREKKQ---CMKGC ^R RYGESD
S-3-3		GDDR ^R ERM ^Q CRHYHDRREKKQ---CMKGC ^R RY
S-4-3		GDDR ^R ERM ^Q QHYHDRREKK ^P ---CMKGC ^R RY
L-1-4 (L-2-4, M-1-4)		GHEHGDR ^Q Q ^T QCKR ^F FRPGSYDRQ ^Q ---CIEK ^Q Q ^Q Q ^Q
S-1-4 (S-2-4)		GHEHGDR ^Q Q ^T QCKR ^L FRPGSYDRQ ^Q ---CIEK ^Q Q ^Q Q ^Q
S-3-4		GHEHGDR ^Q Q ^A QCKR ^F FRPGSYDRQ ^Q ---CIEK ^Q Q ^Q Q ^Q
S-4-4		GHEHGDR ^Q Q ^T QCKR ^L FRPGSYDRQ ^Q ---CIE ^R Q ^Q Q ^Q
L-1-5 (L-2-5) (G7)		HHGGGGHGHGDR ^Q Q ^A QCKR ^F FRPGSYDRW ^Q ---CTERC ^Q SSHQ ^Q D
L-1-6 (L-2-6) (G6)		HHGGGG DQA HGDR ^Q Q ^A QCKR ^Y FRPGSYDRW ^Q ---CTERC ^Q SSHQ ^Q D
M-1-5		HHGGGGHGHGDR ^Q Q ^T QCKR ^F FRPGSYDRW ^Q ---CTERC ^Q SSHQ ^Q D
L-1-7 (L-2-7)		HHGGGGHGHGGSS ^Q EQK ^Q QQR ^Y RHEYEKEQ---CVRD ^Q CKSGGGHGA
M-1-6		HHGGGGHGH ESS S ^Q EQK ^Q QQR ^H RHEY DR Q ^Q ---CVRD ^Q CKSGGGGGA
S-1-5 (S-4-5)		HHGGGGHGHGGSS ^Q EQK ^Q QQR ^Y RHEY DK Q ^Q ---CVRD ^Q CKSGGGGGA
S-2-5 (S-3-5)		H HGGSS ^Q EQK ^Q QQR ^Y RHEYEKEQ---CVRD ^Q CKSGGGHGAGGRGRE

Рис. 2. Аминокислотные последовательности 4-Cys пептидов пшеницы.

Выравнивание выведенных аминокислотных последовательностей 4-Cys пептидов. S – «короткие» предшественники, L – «длинные» предшественники, M – «средние» предшественники.

Литература

- Ajesh K., Sreejith K. Peptide antibiotics: an alternative and antimicrobial strategy to circumvent fungal infections // *Peptides*. 2009. V. 30. P. 999–1006.
- Benko-Iseppon A.M., Galdino S.L., Calsa T. Jr. *et al.* Overview on plant antimicrobial peptides // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010. V. 11. P. 181–188.
- Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. *et al.* Antimicrobial peptides from plants // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1997. V. 16. P. 297–323.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L., Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects, structure and function // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. V. 23. No 4/5. P. 329–44.
- Castro M.S., Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides // *Protein Pept.* 2005. V. 12. P. 13–18.
- da Rocha Pitta M.G., da Rocha Pitta M.G., Galdino S.L. Development of novel therapeutic drugs in humans from plant antimicrobial peptides // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010. V. 11. P. 236–247.
- Dubovskii P.V., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. *et al.* Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 411. No 1. P. 14–18.
- Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V. Diversity of wheat antimicrobial peptides // *Peptides*. 2005. V. 26. P. 2064–2073.
- Gao G.H., Liu W., Dai J.X. *et al.* Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana* // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 10973–10978.
- Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M., Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides // *Biopolymers (Peptide Sci.)*. 1998. V. 47. P. 479–491.
- Garcia-Olmedo F., Rodriguez-Palenzuela P., Molina A. *et al.* Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence // *FEBS Letters*. 2001. V. 498. P. 219–222.
- Farrokhi N., Whitelegge J.P., Brusslan J.A. Plant peptides and peptidomics // *Plant Biotechnol. J.* 2008. V. 6. P. 105–134.
- Huang R-H., Xiang Y., Liu X-Z. *et al.* Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv // *FEBS Lett.* 2002. V. 521. P. 87–90.
- Kido E.A., Pandolfi V., Houllou-Kido L.M. *et al.* Plant antimicrobial peptides: an overview of SuperSAGE transcriptional profile and a functional review // *Curr. Protein Pept.*

- Sci. 2010. V. 11. P. 220–230.
- Koike M., Okamoto T., Tsuda S., Imai R. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 298. P. 46–53.
- Lobo D.S., Pereira I.B., Fragel-Madeira L. *et al.* Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 987–996.
- Manners J.M. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes // *Genome Biol.* 2007. V. 8. P. 225–234.
- Nolde S.B., Vassilevski A.A., Rogozhin E.A. *et al.* Disulfide-stabilized helical hairpin structure of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. No 28. P. 25145–25153.
- Odintsova T.I., Egorov Ts.A., Musolyamov A.Kh. *et al.* Seed defensins from *T. kiharae* and related species: genome localization of defensin-encoding genes // *Biochimie.* 2007. V. 89. P. 605–612.
- Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. *et al.* A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // *FEBS J.* 2009. V. 276. P. 4266–4275.
- Padovan L., Scocchi M., Tossi A. Structural aspects of plant antimicrobial peptides // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010. V. 11. P. 210–219.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B.M. *et al.* Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides // *Plant Physiol. Biochem.* 2008. V. 46. P. 941–950.
- Tavares L.S., de Santos M., Viccini L.F. *et al.* Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers // *Peptides.* 2008. V. 29. P. 1842–1851.
- Van den Bergh K.P.B., Proost P., Van Damme J. *et al.* Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) // *FEBS Letters.* 2002. V. 530. P. 181–185.
- Van der Weerden N.L., Lay F.T., Anderson M.A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 14445–14452.
- Vasil I.K. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 1133–1154.

WHEAT ANTIMICROBIAL PEPTIDES

T.I. Odintsova¹, T.V. Korostyleva¹, L.L. Utkina², Ya.A. Andreev², A.A. Slavokhotova¹,
E.A. Istomina¹, V.A. Pukhal'skii¹, T.A. Egorov²

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: odintsova2005@rambler.ru;

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Summary

Antimicrobial peptides (AMPs) are low-molecular-weight defense polypeptides, produced in all living organisms either constitutively or upon perception of signals from pathogenic microorganisms. They are important components of the immune system in both animals and plants. AMPs differ in structure and mode of action. Most of them belong to cysteine-rich peptides; their molecules contain even numbers of cysteine residues involved in the formation of disulphide bonds, which stabilize the peptide structure. A number of families of plant AMPs have been isolated on the base of amino acid sequence similarity and 3D structure. Plant AMP genes can be used in the engineering of pest resistance in crops and development of novel antibiotics and antimycotics. We provide a concise review of properties and gene structures of major AMP families discovered by the authors in *Triticum kiharae* seeds, including glycine-rich peptides, defensins, hevein-like peptides and the so-called 4-Cys peptides.

Key words: wheat, *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch., antimicrobial peptides, amino acid sequencing, 3'- and 5'-RACE method, plant immunity, regulation of gene expression.